



INFORME PERIODO.....2012.- 2013..

1. APELLIDO...Toledo

Nombre(s). Juan Domingo ...

Título(s).....Dr. en Ciencias Bioquímicas,.U.N.L.P.....

Dirección Electrónica

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría.....Profesional AdjuntoMes.....noviembre Año...1993.....

ACTUAL: Categoría.....Profesional Principal ...Mes.....mayoAño...1998....

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

a) CONICET. PIP 112-200801-00953. Título: Dominios de la apolipoproteína A-I (apoA-I) humana involucrados en la remoción del colesterol y en el plegamiento anómalo. - 1/1/2009-31/12/2011.prorrogado hasta 2013

b) SeCyT-UNLP. Código proyecto: 11/M156

Título: Las hélices centrales de apolipoproteína A-I humana: Adaptabilidad conformacional y función en las primeras etapas del transporte reverso de colesterol.

Inicio: 01/01/2011. Finalización 31/12/2014. Director: H. Garda

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s)... GARDA Horacio Alberto..

Cargo Institución.. Investigador Principal , CONICETINIBIOLP, Fac Cs. Medicas ..

Dirección: Calle.....60 y 120NºCiudad.....La Plata

C. P..1.900..Prov. Buenos Aires ..Tel. 4824894

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución.....INIBIOLP, CONICET –UNLP ..

Dependencia.....Fac de Cs. MédicasDirección: Calle...60 y 120 N °.....

Ciudad.....La PlataC. P1900.....Prov.. Buenos Aires....Tel.....4824894

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre....Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, UNLP..

Dependencia Fac de Cs. Médicas,.....UNLP.. Dirección: Calle.....60 y 120 ..Nº.....

Ciudad.....La Plata.....C.P 1900.....Prov..Buenos Aires Tel....4824894..

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

Mi actividad científica durante el ultimo año se desarrollo principalmente en estudios sobre procesos celulares relacionados con aterogénesis y su vinculación con procesos inflamatorios

Introducción

La aterosclerosis y la obesidad son dos patologías que comparten un estado inflamatorio subyacente en el organismo y que repercute en la progresión de ambas enfermedades. Ambas patologías comparten la implicación de gran número de citoquinas proinflamatorias a lo largo del proceso de desarrollo. La obesidad se caracteriza por una mayor infiltración de monocitos circulantes en el tejido adiposo blanco donde se diferencian a macrófagos con polarización predominante hacia el fenotipo M1 (proinflamatorio). El desarrollo de la placa aterosclerótica se inicia asimismo con el reclutamiento de monocitos circulantes en zonas con deposición lipídica o daño físico que se diferencian a macrófagos y adquieren un fenotipo inflamatorio determinado en función de los estímulos lipídicos y hormonales del medio. Se ha descrito como las LDL oxidadas contribuyen a la polarización hacia el fenotipo M1 a través de la activación de receptores Toll-like 4 (TLR4), mientras que en macrófagos de tejido adiposo blanco se han detectado niveles de expresión elevados de TLR4.

Los glucocorticoides son antiinflamatorios actuando en la resolución de la inflamación mediante, entre otras acciones, la activación de macrófagos por la vía alternativa M2c antiinflamatorios. Se considera que los glucocorticoides están implicados en el desencadenamiento y/o mantenimiento de la obesidad, igual que se ha postulado para la aterosclerosis.

A nivel de tejidos periféricos, entre ellos las células del sistema inmune, la señal glucocorticoide puede verse amplificada o inhibida por la actividad de las enzimas 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 1 (11 β HSD1) y de tipo 2 (11 β HSDH2) respectivamente.

El objetivo fue estudiar la expresión de genes implicados en el proceso inflamatorio y del metabolismo de glucocorticoides en macrófagos (RAW 246.7) por efecto de la exposición LDL oxidadas

Metodología utilizada

Células : Se utilizaron macrófagos murinos (RAW 264.7) crecidos en medio DMEM con 10%SFB.

Obtención de LDL oxidadas (LDL-Ox):

LDL nativas fueron peroxidadas a tres niveles: bajo (L), medio (M) y alto (H) por exposición a Cu⁺⁺ 5 μ M durante 4, 8 o 24 hs, respectivamente. Luego de dializados overnight, los preparados se caracterizaron para determinar su grado de peroxidación mediante las técnicas:

Substancias reactivas al tiobarbiturato (TBARS), dienos conjugados (DC) y carbonilos proteicos (CPs).

Viabilidad celular:

Se cultivaron los macrófagos RAW 264.7 hasta semi-confluencia y se trataron con 100 μ g/mL de LDL nativa (N) y peroxidada a tres niveles: bajo (L), medio (M) y alto (H) por exposición a Cu⁺⁺ 5 μ M durante 4, 8 o 24 hs, respectivamente. El porcentaje de células viables y no viables fue determinado por exclusión de azul tripán.

Expresión de genes involucrados en el proceso inflamatorio:

Hemos seleccionado LDL-Ox (M) para evaluar la expresión de genes involucrados en el proceso inflamatorio como ser: factor de necrosis tumoral α (TNF α), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), interleuquina 6 (IL6), ácido graso translocasa (FAT/CD36), receptor de interleuquina 10 (rIL10), receptor de factor de crecimiento transformante (rTGF), Glucosa 6 fosfato translocasa (G6T), 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β HSD2) y hexosa 6 fosfato deshidrogenasa (H6PDH). Células RAW 264.7

fueron tratadas con LDL-Ox (M) por 4, 8, 12 y 24 hs a una concentración final de 100 μ M. El nivel de expresión del ARN mensajero (ARN m) de los diferentes genes fue cuantificado por real-time PCR (RT PCR).

Resultados

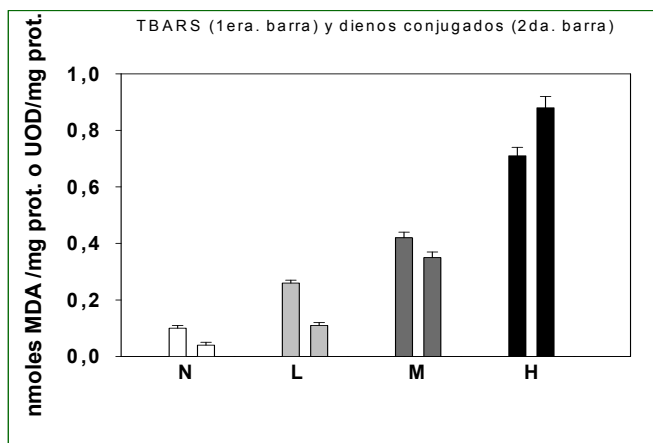
En la figura 1 se observa un incremento de la producción de peroxidación lipídica (TBARS y dienos conjugados) y de la formación de carbonilos proteicos en células Raw 246.7 con una relación directa al grado de oxidación de la LDL presente en el medio. Asimismo, un mayor daño oxidativo hace disminuir la viabilidad celular como se observa en la figura 2.

La expresión génica de marcadores del estado inflamatorio y antiinflamatorio se muestran en la figura 4. Se observa un incremento en la expresión génica de factores proinflamatorios como TNF α , IL6 y iNOS siendo más importante entre las 4 y 12 h de exposición a LDL oxidadas. La expresión génica de FAT/CD36 incrementa unas 10 veces respecto de los controles entre entre las 12h y 24h indicando la activa captación de LDL- Oxid y en consecuencia la formación de células espumosas.

En cuanto a la expresión génica de factores indicativos de una activación en un sentido antiinflamatorio se encuentra una disminución respecto de los controles de rTGF. Sin embargo, se observa a la vez un incremento de factores como rIL10 entre 8h y 12h. Señalar que rTGF incrementa la expresión a las 8h y 12 h en relación a las células expuestas 4h con LDL oxidadas.

En relación a la expresión génica de enzimas implicados en el metabolismo de los glucocorticoides se observa un incremento de G6T y H6PDH que se relaciona con un incremento de expresión de la 11 β HSD1 y en consecuencia activación de glucocorticoides con acción antiinflamatoria. También se observa que la presencia de LDL oxidadas promueve un incremento de la expresión de la 11 β HSD2 entre 8h y 12h relacionándose con inactivación del glucocorticoide y promoción de la inflamación.

A



B

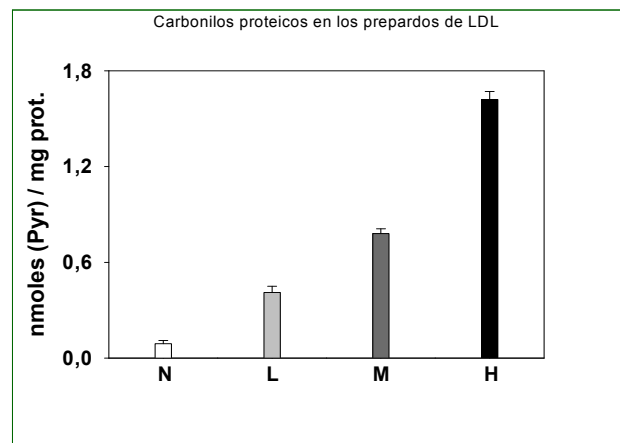
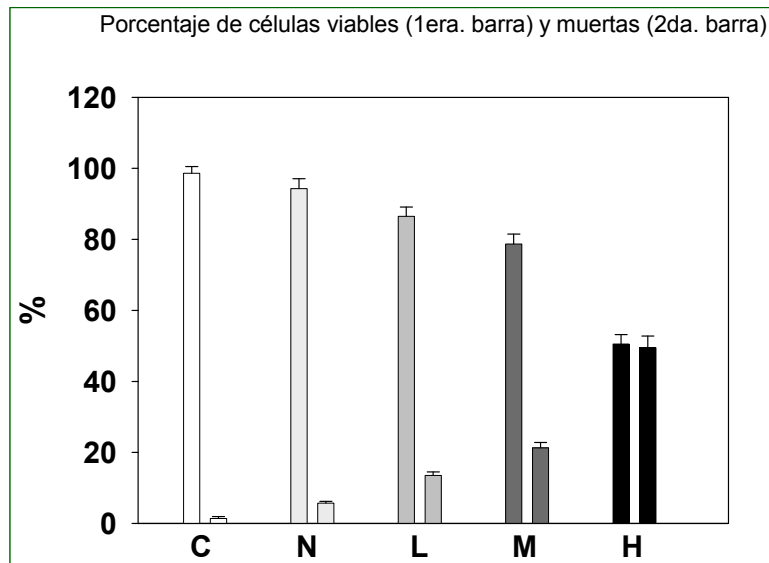


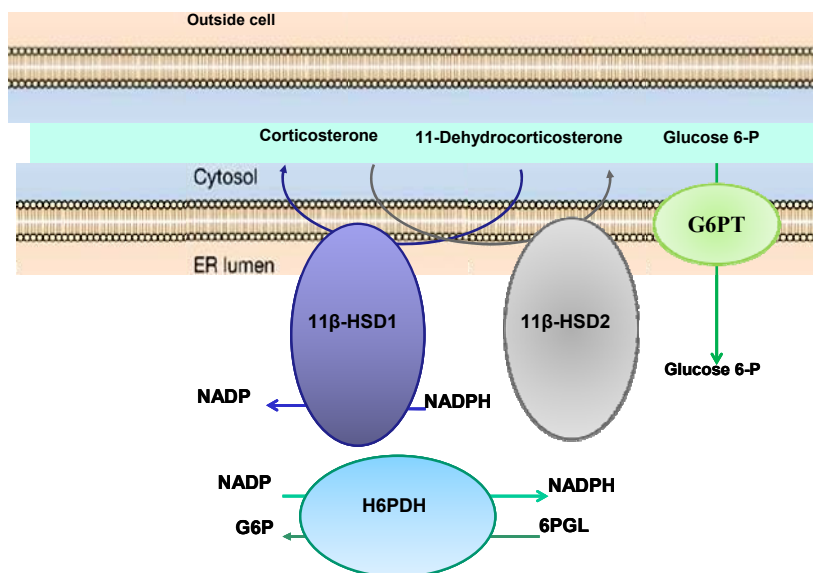
Fig. 1: A- Efecto de la peroxidación de LDL nativa (N) por exposición a iones Cu⁺⁺ 5 μ M durante 4 (L), 8 (M) o 24 (H) hs, sobre los indicadores de peroxidación lipídica TBARS (1era. barra) y dienos conjugados (2da. barra). B- Efecto de la peroxidación de LDL nativa (N) por exposición a iones Cu⁺⁺ 5 μ M durante 4 (L), 8 (M) o 24 (H) hs, sobre la formación de carbonilos proteicos.

Fig. 2



Efecto de la peroxidación de LDL sobre la viabilidad celular estimada por exclusión de azul trypan. Células viables (1era. barra) y no viables (2da. barra).

Fig. 3 Activación e inhibición de glucocorticoides por 11 β -HSD tipo1 y tipo2



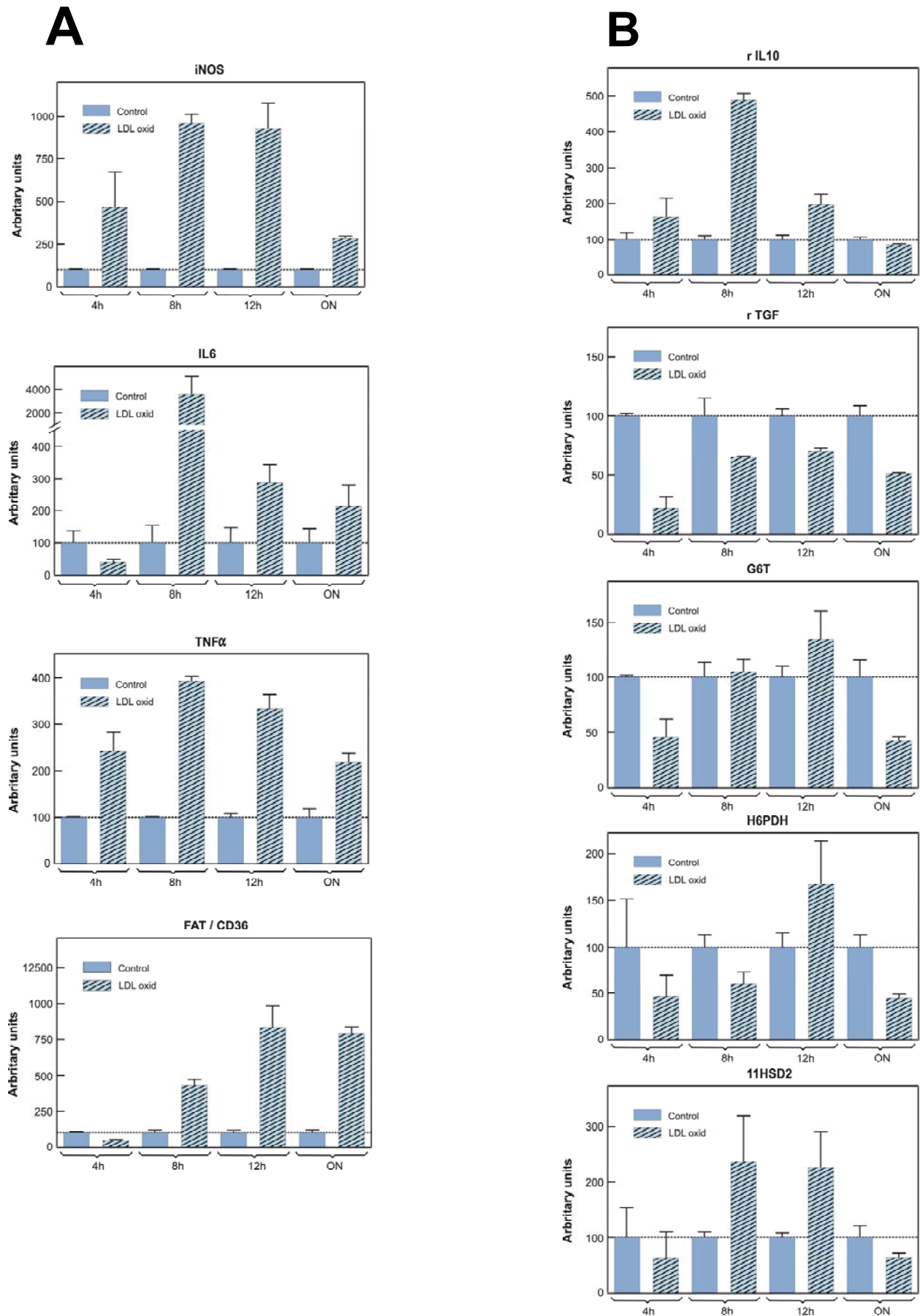


Fig. 4: Expresión génica de factores pro (A) y anti-inflamatorios (B) luego de estimular a células RAW con LDL- ox (M) a distintos tiempos.

*P<0.05 control vs LDL Oxid.

P<0.05 LDL Oxid 8, 12, ON vs LDL Oxid 4 hs.

+ P<0.05 LDL Oxid 12, ON vs LDL Oxid 8 hs.

° P<0.05 LDL Oxid 12 vs LDL Oxid ON .

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.

” Apolipoprotein A-I Helsinki promotes intracellular acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) protein accumulation”

Juan D. Toledo • Horacio A. Garda • Laura V. Cabaleiro • Angela Cuellar •

Magali Pellon-Maison • Maria R. Gonzalez-Baro • Marina C. Gonzalez

Publicación electrónica : **Mol Cell Biochem.** DOI 10.1007/s11010-013-1585-y

fecha 03-03-2013

Impreso y publicado en **Mol Cell Biochem**, **377**, pag. 197-205, **2013**

8.2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. Indicar la denominación del curso, carga horaria, institución que lo dictó y fecha, o motivos del viaje, fecha, duración, instituciones visitadas y actividades realizadas.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES. In

“ Effect of LDL-Ox on genes related to inflammatory process

González MC; Ledda A; Grassa MM; ¹Toledo JD; Garda H, Rafols M.

XLVIII reunión anual de Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular

(SAIB).. **Mendoza, Argentina 29 de octubre -1 de noviembre de 2012** Resumen publicado en Biocell

Vol. 36 Supplement 2012 ISSN 1667-5746 (electronic) , 0327.9545 (print), CB-P33, pag. 6

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

Clase de Seminarios sobre temas del curso anual de Bioquímica y Biología Molecular , correspondiente al 3° año de la carrera de Cs. Médicas .:

Seminarios de :

“Aminoácidos y Proteínas “

“Metabolismo de Glucidos I” (Glicólisis, Gluconeogénis, Descarbolilación oxidativo del Piruvato

“Control de la proliferación celular y la apoptosis: mecanismos moleculares de la carcinogenesis”.

“Integración metabólica”

Trabajo práctico de laboratorio de cinética enzimática :

”Determinación del Km y Vmax de glucosa oxidasa”

Clases teoricas

Enzimas reguladores.

Relevancia bioquímica Sensibilidad enzimática. Ventajas de cinética sigmoidea. Cooperatividad

Interacciones homotrópicas y heterotrópicas

Ventajas de los complejos enzimáticos .

Sistema piruvato-deshidrogenasa, como ejemplo de complejos multienzimáticos

Aplicaciones clínicas de enzimas. Anticuerpos enzimáticos

Estructura y función de complejos transportadores de electrones mitocondriales

F1-F0 ATP sintetasa : un motor molecular. Catalisis rotacional

Redacción de exámenes parciales y supervisión de exámenes parciales.

Exámenes finales de la materia

Actividades docentes extra-calendario, clases de consulta etc .